



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von R- α -Liponsäure mittels Fermentation, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.

JC17 Rec'd PCT/PTO 08 JUN 2005

Verfahren zur fermentativen Herstellung von R- α -Liponsäure

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung der R- α -Liponsäure und für das Verfahren besonders geeignete Zellen.

R- α -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- α -Liponsäure jeweils mit seiner Carboxylgruppe unter Bildung eines sogenannten Lipoamids kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- α -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppen-überträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren. Außerdem fungiert R- α -Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

α -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der α -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme. α -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " α -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der α -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz, zu verstehen.

Die Biosynthese von R- α -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 1). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kovalent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-

ACP) übertragen, wobei R- α -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-], dem *lipA*-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- α -Liponsäure von R- α -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem *lipB*-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- α -Lipoyl-ACP oder R- α -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178).

E. coli kann aber auch freie R- α -Liponsäure aus dem umgebenden Medium aufnehmen und für die Bildung funktioneller α -Ketosäure-Dehydrogenasen verwenden. Dazu wird R- α -Liponsäure zunächst mittels ATP zu R- α -Lipoyl-AMP aktiviert und anschließend auf die entsprechenden Enzym-Untereinheiten übertragen (s. Fig. 2). Beide Aktivitäten werden von der Lipoyl-Protein-Ligase A [EC 6.-.-.-], dem *lplA*-Genprodukt, katalysiert (Morris et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 16091-16100). Diese LplA-Aktivität ist für Wildtypstämme von *E. coli* allerdings nicht essentiell, wenn die endogene Liponsäure-Synthese und der Transfer der Lipoyl-Gruppe über den LipA/LipB-Weg erfolgt. So wurden beispielsweise *lplA*-Mutanten beschrieben, die keine nachweisbare Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität mehr besitzen, deren Phänotyp aber unter normalen Wachstumsbedingungen nicht von einer Wildtyp-Zelle zu unterscheiden ist (Morris et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 16091-16100; Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10).

Über die Biosynthese von R- α -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- α -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh

die Bedeutung der α -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt: α -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist α -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der α -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie Ascorbinsäure oder α -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der α -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Glutathion, dem sogenannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu. α -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden, eingesetzt.

Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der α -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der α -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist. So wurde im *in vitro*-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- α -Liponsäure zur Bildung funktioneller α -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der Enzymaktivität durch R- α -Liponsäure. Die Reduktion von α -Liponsäure und damit die Regeneration der antioxidativ wirksamen α -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des weiteren hat R- α -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulin-resistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem

einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert, α -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

5

Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von α -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Yadav et al., 1990, J. Sci. Ind. Res. 49: 400-409). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der α -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et. al, 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen eingeführt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner α -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

35

Die Anmeldungen am Deutschen Patent- und Markenamt mit den Aktenzeichen 10235270.4 und 10245993.2 beschreiben ein Verfahren, bei dem die Produktion von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozeß erfolgt.

5 Dabei werden Zellen eingesetzt, die ein Liponsäure-Synthase-Gen bzw. ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen einzeln oder auch in Kombination überexprimieren. Die Produktion von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure erfolgt allerdings in noch sehr beschränktem Ausmaß, so dass diese fermentativen Verfahren
10 derzeit noch nicht mit der chemischen Synthese konkurrieren können.

Nur in seltenen Fällen führt jedoch eine einzige genetische Manipulation im Zuge des sogenannten "metabolic engineering"
15 eines Wildtypstammes zur Überproduktion der gewünschten Verbindung in ausreichendem Umfang. Vielmehr ist dazu eine Kombination von gezielten genetischen Manipulationen notwendig, oftmals noch ergänzt durch klassische Mutagenese/Screening-Ansätze.

20 Entsprechend ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein leistungsfähigeres Verfahren zur fermentativen Herstellung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure bereitzustellen.

25 Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und
30 die enantiomerenreine R- α -Liponsäure vom Kulturmedium abgetrennt wird.

Unter einer abgeschwächten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen,
35 dass die intrazelluläre Aktivität des LplA-Proteins in der Zelle im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle um 25 bis 100 %, besonders bevorzugt um 75 bis 100 %, verringert ist. Ganz be-

sonders bevorzugt ist die intrazelluläre Aktivität des LplA-Proteins völlig ausgeschaltet.

Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass
5 Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- α -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178). Die Lipoyl-Protein-Ligase
10 A ist nicht an der *de novo*-Synthese von R- α -Liponsäure beteiligt, vielmehr besteht die Aktivität dieses Enzyms in der Kopplung von freier R- α -Liponsäure an die E2-Untereinheiten von α -Ketosäure-Dehydrogenasen. Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass eine Verringerung oder die vollständige Aus-
15 schaltung der Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität in einem Wildtyp-Stamm zur Anhäufung freier, enantiomerenreiner R- α -Liponsäure im Kulturmedium dieser Zellen führt, obwohl sowohl in einem *E. coli* Wildtyp-Stamm als auch in einer *lplA*-Mutante alle Lipoyl-Bindestellen der E2-Untereinheiten mit R- α -
20 Liponsäure abgesättigt sind (Packman et al., 1991, Biochem. J. 277: 153-158; Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10) und somit das Substrat des LplA-Proteins (eine unbeladene E2-Untereinheit) fehlt. Darüber hinaus ist die Expression des *lplA*-Gens in einem *E. coli* Wildtyp-Stamm ohnehin nur äußerst
25 schwach. Entsprechend kommen nur wenige Moleküle (< 10) der Lipoyl-Protein-Ligase A in einer Zelle vor (Green et al., 1995, Biochem. J. 309: 853-862). Es ist daher umso erstaunlicher, dass nun eine Verringerung oder vollständige Ausschaltung der Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität die Exkretion von
30 R- α -Liponsäure zur Folge hat.

Die Ausscheidung freier R- α -Liponsäure aus den Zellen erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor aufgebrochen werden müssen bzw. ohne dass die R- α -Liponsäure
35 durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss.

Unter der vom *lplA*-Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität ist diejenige Lipoyl-Protein-Ligase-Aktivität einer Zelle zu verstehen, welche eine deutliche Substratpräferenz für freie R- α -Liponsäure im Vergleich zu R- α -Lipoyl-ACP aufweist. Das *LplA*-Protein hat mit freier R- α -Liponsäure etwa eine 100-fach höhere Aktivität, als mit R- α -Lipoyl-ACP. Damit unterscheidet sich die Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität einer Zelle eindeutig von der Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität, welche R- α -Lipoyl-ACP gegenüber freier R- α -Liponsäure als Substrat bevorzugt (s. Fig. 1 und 2).

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Lipoyl-Protein-Ligase A-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNA-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität und Spezifität der durch das Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase A erhalten bleibt.

Das Lipoyl-Protein-Ligase A-Gen codiert für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 35 %.

Vorzugsweise ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus GAP (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

Dem Fachmann sind zur Abschwächung einer Enzymaktivität in einer Zelle eine Reihe von Möglichkeiten bekannt. Eine Abschwä-

chung kann beispielsweise durch Verminderung der Expression des entsprechenden Gens erzielt werden oder durch Austausch des chromosomalen Wildtyp-Gens gegen ein mutiertes Allel, das für ein Enzym mit einer verminderten Aktivität codiert. Im Extremfall kann die Enzymaktivität auch völlig ausgeschaltet werden.

Die Expression eines Gens kann zum Beispiel durch folgende Maßnahmen verringert oder verhindert werden:

- Abschwächung des Promotors durch geeignete Basensubstitutionen
- Inaktivierung/Veränderung eines für die Expression nötigen Transkriptionsaktivators
- Abschwächung von Translationsstartsignalen (z. B. Ribosomenbindestelle, Startcodon) durch geeignete Basensubstitutionen
- Entfernung von mRNA-stabilisierenden Regionen des Gens
- Überexpression von für spezifische Antisense-RNA codierenden DNA-Bereichen
- Deletion des gesamten Gens oder zumindest eines wichtigen Teils davon
- Zerstörung des Gens durch Insertion von beispielsweise einer Antibiotikumsresistenzkassette

Mutierte Allele eines Gens, die für ein Enzym mit einer verminderten Aktivität codieren, können beispielsweise durch folgende Maßnahmen erzeugt werden:

- Einführung von Leserasterverschiebungen in das entsprechende Gen aufgrund von Nukleotid-Deletionen oder -Insertionen
- Einführung spezifischer Basensubstitutionen im Gen, welche den Austausch von konservierten oder von für die Aktivität essentiellen Aminosäuren zur Folge haben

Mutierte Allele des *lplA*-Gens können mit Standardmethoden der Molekularbiologie erzeugt werden. Eine bevorzugte Möglichkeit dafür besteht in der Einführung spezifischer Basensubstitutionen in das Gen. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass während der Amplifikation des *lplA*-Gens mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Verwendung von speziellen

mutagenen Primern die Basensequenz des Gens oder seines Promotors an einer oder mehreren Positionen spezifisch verändert werden (ortspezifische Mutagenese).

Besonders bevorzugt ist die Einführung einer Deletion in das *lplA*-Gen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass das Gen nach der Amplifikation mittels PCR unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette *lplA*-Gen erfassen, zunächst in einen Plasmid-Vektor (z.B. pUC18, pBR322, pACYC184) kloniert wird. Durch Restriktion des so erhaltenen Plasmids mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, die nur im Bereich des *lplA*-Gens schneiden, können interne Regionen des Gens entfernt werden. Auf diese Weise kann nach Religation des restringierten Plasmids eine interne Deletion in das *lplA*-Gen eingeführt werden. Alternativ zur Religation des im *lplA*-Gen restringierten Plasmids kann auch eine Antibiotikumsresistenzkassette in das *lplA*-Gen kloniert werden.

Methoden zum Austausch einer beliebigen chromosomalen DNA-Sequenz gegen eine zwar homologe, aber durch Baseninsertionen, -deletionen oder -substitutionen veränderte Sequenz sind dem Fachmann bekannt. So kann in *Escherichia coli* beispielsweise das von Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237) beschriebene System verwendet werden, um mittels integrativer Plasmide über den Mechanismus der homologen Rekombination die chromosomale Wildtyp-Sequenz des *lplA*-Gens gegen ein mutiertes *lplA*-Allel auszutauschen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Zellen eingesetzt, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren und eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweisen, wobei sie anstelle eines Wildtyp *lplA*-Gens ein *lplA*-Allel besitzen, das eine Basensubstitution im Bereich der Basenpaare 367-465 aufweist, welche dazu führt, dass das LplA-Protein eine um mindestens 50 % verminderte Aktivität hat, oder eine Deletion im *lplA*-Gen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch eine Zelle mit vorgenannten Eigenschaften.

Vorzugsweise ist die Aktivität des LplA-Proteins um 50 bis 100%, besonders bevorzugt um 75% bis 100%, vermindert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zellen führt eine Basensubstitution in dem genannten Genbereich dazu, dass keine Aktivität des LplA-Proteins mehr nachweisbar ist.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zellen befindet sich auf dem Chromosom des Wirtsorganismus nur noch ein durch eine interne Deletion erzeugtes Fragment des *lplA*-Gens, welches nicht mehr für eine funktionelle Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität codieren kann.

Zellen mit abgeschwächter Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität lassen sich dadurch herstellen, dass in eine Ausgangszelle anstelle des *lplA*-Wildtyp-Gens ein *lplA*-Allel codierend für ein LplA-Protein mit einer um mindestens 50 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein verminderten Aktivität eingebracht wird.

In einer Vielzahl von pro- und eukaryontischen Zellen bzw. Organismen konnten Gene, die für eine Lipoyl-Protein-Ligase A codieren, sowie Gene, die für die *de novo*-Synthese von R- α -Liponsäure benötigt werden (z.B. *lipA*, *lipB*), identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- α -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

Zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen können Ausgangszellen verwendet werden, die bisher noch keinerlei Manipulation unterzogen wurden.

5 Des weiteren ist es jedoch möglich, die erfindungsgemäßen Zellen auch mit Maßnahmen zu kombinieren, die bereits zu einer verbesserten Produktion von R- α -Liponsäure führen. So sind beispielsweise solche Zellen besonders geeignet, die durch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression des *lipA*-
10 Gens bereits eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität aufweisen und/oder durch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression des *lipB*-Gens bereits über eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügen. Die Herstellung von Zellen mit einer im
15 Vergleich zum Wildtyp verstärkten Liponsäure-Synthase-Aktivität und/oder einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität sind in den Patentanmeldungen DE 10235270 und DE 10245993 beschrieben.

20 Die Erfindung betrifft somit insbesondere auch Zellen, die zusätzlich zur um mindestens 50 % verminderten oder fehlenden Aktivität des LplA-Proteins durch eine verstärkte Expression des *lipA*-Gens über eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität oder durch eine verstärkte Expression des *lipB*-Gens bereits
25 über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügen.

Bevorzugt handelt es sich bei den Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der
30 Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

Die Gewinnung von R- α -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise
35 Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion und/oder Präzipitation des Produkts, erfolgen.

Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- α -Liponsäure erfolgt vorzugsweise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

- 5 Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren bzw. deren Salze verwendet werden. Dabei werden bevorzugt Asparaginsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure, Glutaminsäure, Glucose, Glycerin oder Oxalessigsäure eingesetzt.
- 10 Besonders bevorzugt sind Bernsteinsäure und Oxalessigsäure. Auch ist eine kombinierte Fütterung mehrerer verschiedener Kohlenstoffquellen möglich. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure), als spe-
- 15 zifische Vorstufen für die α -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 0,1-30 g/l.

- Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugs-
- 20 weise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

- Als optimaler Temperaturbereich werden 15 - 55 °C bevorzugt.
- 25 Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

- Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- α -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäure-
- 30 auxotrophen Indikatorstammes (*lipA*-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- α -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645) würde allerdings
- 35 auch ohne supplementierte R- α -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay bei der Bestimmung der produzierten R- α -Liponsäure zu vermei-

den - beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- α -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat - erfolgt bereits die Anzucht des R- α -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110 Δ lplA, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15299 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt. Die Plasmide pKP477 und pBAD-lipB sind in der Patentanmeldung DE 10245993 beschrieben.

Beispiel 1: Konstruktion einer chromosomalen Mutation im lplA-Gen des Wirtsorganismus

A) Amplifikation des lplA-Gens

Das lplA-Gen aus *E. coli* wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Pwo-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Matrize diente die chromosomale DNA des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die 3'-phosphorothioatgeschützten Oligonukleotide lplA-fwd und lplA-rev mit folgenden Sequenzen verwendet:

lplA-fwd: (SEQ ID NO: 3)

5'- CGG GAT CCC TAT CTG CGC CTG ACA CTC GAC -3'

BamHI

lplA-rev: (SEQ ID NO: 4)

5'- CGG GAT CCT TTA TCT GAA CCG CCA TTT GCG CTG -3'

BamHI

Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 1,6 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptions-

säulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

B) Konstruktion des Plasmids pKO3- Δ lplA

5 In das PCR-Fragment wurden über die Primer-Sequenzen Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI (Erkennungssequenz in den Oligonukleotiden unterstrichen) eingeführt. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen ge-
10 schnitten, anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und dann mittels des GENE CLEAN Kits (BIO 101 Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

Zur Klonierung des *lplA*-Gens wurde der Vektor pUC18 (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Deutschland) mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das PCR-Fragment mittels der GENE CLEAN-Methode gereinigt.

20 Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α mit dem Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf
25 LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.

Das auf diese Weise erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pUC18-*lplA*.

35 Um nun eine interne Deletion in das *lplA*-Gen einzuführen, wurde der Vektor pUC18-*lplA* mit den Restriktionsenzymen *Nru*I und *Stu*I, die jeweils einmal innerhalb des *lplA*-Gens schneiden, verdaut und der Vektor wie oben beschrieben mittels T4-DNA-

Ligase religiert, anschließend transformiert und überprüft. Dadurch wurde ein zentraler Bereich des *lplA*-Gens um 197 Basenpaare deletiert und gleichzeitig eine Leserasterverschiebung eingeführt, wodurch das Gen inaktiviert wurde. Das resultierende Plasmid pUC18- Δ *lplA*, das nun den verkürzten Leserahmen " Δ *lplA*" enthält, wurde mit dem Enzym *Bam*HI geschnitten und das 1,4 kb DNA-Fragment, welches das Δ *lplA*-Genfragment beinhaltet, wurde in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pKO3 (Link et al., 1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237) kloniert. Das auf diese Weise erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pKO3- Δ *lplA*.

C) Austausch des chromosomalen *lplA*-Wildtyp-Gens gegen das deletierte *lplA*-Allel aus pKO3- Δ *lplA*

Das Plasmid pKO3- Δ *lplA* wurde wie oben beschrieben mittels Transformation in den Stamm W3110 eingebracht, wobei plasmidtragende Klone über die dadurch erworbene Chloramphenicol-Resistenz (20 mg/l Chloramphenicol) selektiert werden konnten. Der Austausch des chromosomalen *lplA*-Wildtyp-Gens gegen das deletierte Δ *lplA*-Allel aus pKO3- Δ *lplA* erfolgte mittels homologer Rekombination entsprechend der Prozedur von Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237), wobei durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Saccharose-Agarplatten gleichzeitig auf Auflösung der Cointegrate sowie auf Verlust des Plasmids, welches nun das *lplA*-Wildtyp-Gen enthielt, selektiert werden konnte. Saccharose-resistente Einzelkolonien wurden mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *lplA*-fwd (SEQ ID NO: 3) und *lplA*-rev (SEQ ID NO: 4) überprüft, ob der chromosomale Austausch des *lplA*-Wildtyp-Gens gegen die deletierte Variante Δ *lplA* erfolgreich war. Der auf diese Weise erzeugte Stamm trägt die Bezeichnung W3110 Δ *lplA*.

Beispiel 2: Herstellung von R- α -Liponsäure-Produzenten

Das *lipB*-Überexpressionsplasmid pBAD-*lipB* wurde mittels Elektroporation in die *E. coli*-Stämme W3110 Δ *lplA* und W3110 transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin wurde das Plasmid aus jeweils einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonukleasen gespalten

und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pKP477, das neben dem Ampicillin-Resistenzgen nur die Regulationssequenzen des Arabinose-Operons von *E. coli* (*araC*-Gen, *araBAD*-Promotorregion) enthält, wurde in analoger Weise verfahren.

Beispiel 3: Fermentative Produktion von R- α -Liponsäure

Für die fermentative Produktion von R- α -Liponsäure wurden die in Beispiel 2 genannten Stämme sowohl mit als auch ohne Plasmid verwendet. Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l K₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 1 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,1 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,5 g/l Na₃Citrat x 3 H₂O; 0,2% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l Na₂Succinat x 6 H₂O; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem 100 mg/l Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler. Die Expression des Lipoyl-Protein-Ligase B-Gens auf dem Plasmid pBAD-lipB wurde durch Zugabe von 0,2 g/l L-Arabinose nach ca. 4 h Inkubation induziert. Nach 24 h Inkubation wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- α -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A: 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte freier R- α -Liponsäure im jeweiligen Kulturüberstand nach 24 h Inkubation:

Tabelle 1:

Stamm	R- α -Liponsäure [μ g/l]
W3110	0
W3110 Δ lp1A	25

W3110 pKP477	0
W3110 Δ lplA pKP477	27
W3110 pBAD-lipB	25
W3110 Δ lplA pBAD-lipB	191

PCT

Co 10227

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 13.11.2003 12:31:59 PM

0-1	Formular - PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0-1-1	erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.92 (aktualisiert 01.07.2003)
0-2	Internationales Aktenzeichen.	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	Co 10227
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	13
1-2	Zeile	7-11
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	15 November 2002 (15.11.2002)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 15299
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1-6	Gesondert eingereichte Angaben	KEINE
	Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	JA
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	GRIET MATTHYS

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner R- α -Liponsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle,
5 die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.
- 10 2. Zelle, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert und eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass sie anstelle eines Wildtyp *lplA*-Gens ein *lplA*-Allel besitzt,
15 das eine Basensubstitution im Bereich der Basenpaare 367-465 aufweist, welche dazu führt, dass das *LplA*-Protein eine um mindestens 50 % verminderte Aktivität hat, oder eine Deletion im *lplA*-Gen aufweist.
- 20 3. Zelle nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass keine Aktivität des *LplA*-Proteins mehr nachweisbar ist.
4. Zelle nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass
25 sie über eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität oder über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügt.
5. Zelle nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet,
30 dass sie ein Mikroorganismus wie zum Beispiel ein Hefe- oder Bakterienstamm ist.
6. Zelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der
Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, bevorzugt die Art *Escherichia coli*, ist.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-

Aktivität aufweist, eine Zelle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6 eingesetzt wird.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der enantiomerenreinen R- α -Liponsäure durch Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums und anschließende Extraktion oder Präzipitation der R- α -Liponsäure aus dem zellfreien Kulturmedium erfolgt.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 7 oder 8 dadurch gekennzeichnet, dass im Kulturmedium eine Kohlenstoffquelle ausgewählt aus der Gruppe der verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organischen Säuren eingesetzt wird.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure), dem Kulturmedium zugesetzt werden.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 0,1-30 g/l verwendet wird.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von 16 - 150 h im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

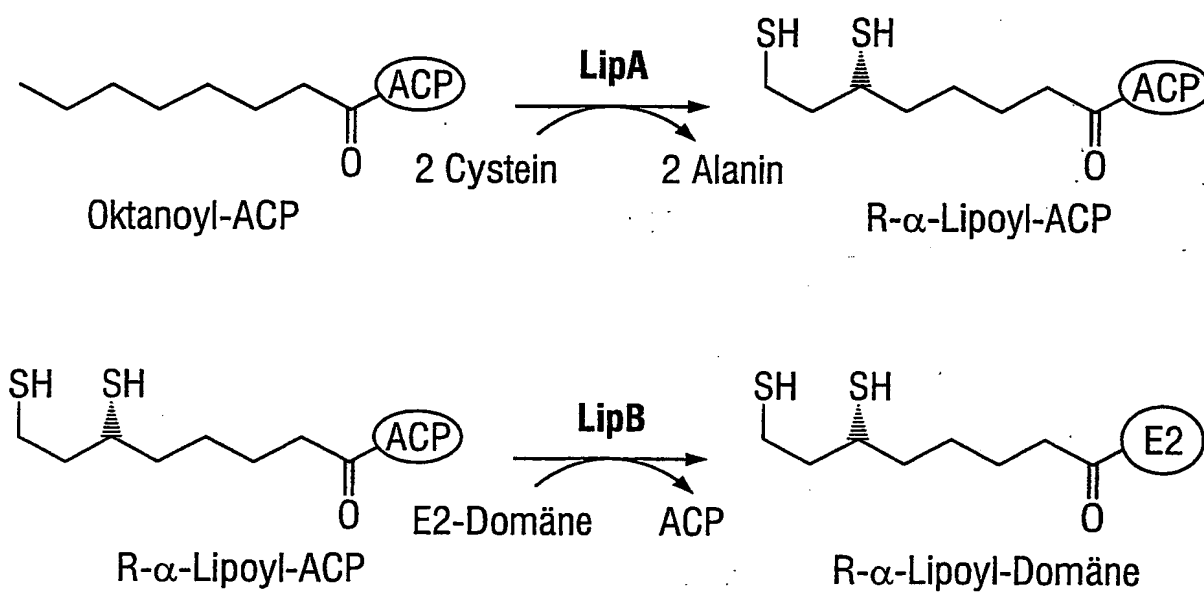
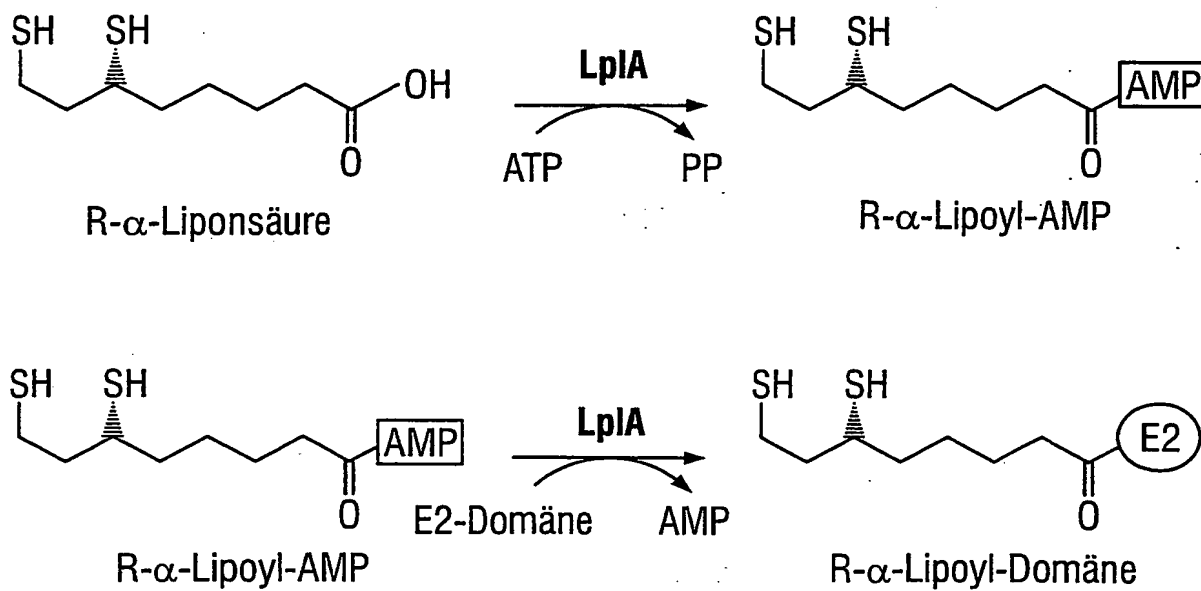
Fig. 1: Synthese der R- α -Liponsäure in *E. coli*

Fig. 2: Aktivierung und Einbau freier R- α -Liponsäure bei *E. coli* mittels der Lipoyl-Protein-Ligase A



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> Zellen und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung
von R-alpha-Liponsaeure

<130> Co 10227

10 <140>

<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1017

<212> DNA

20 <213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1014)

25

<300>

<301> Morris, Timothy W.

Reed, Kelynn E.

Cronan Jr., John E.

30 <302> Identification of the Gene Encoding Lipocate-Protein
Ligase A of Escherichia coli

<303> J. Biol. Chem.

<304> 269

<305> 23

35 <306> 16091-16100

<307> 1994

<400> 1

40 atg tcc aca tta cgc ctg ctc atc tct gac tct tac gac ccg tgg ttt 48
Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe
1 5 10 1545 aac ctg gcg gtg gaa gag tgt att ttt cgc caa atg ccc gcc acg cag 96
Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln
20 25 3050 cgc gtt ctg ttt ctc tgg cgc aat gcc gac acg gta gta att ggt cgc 144
Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg
35 40 45gcg cag aac ccg tgg aaa gag tgt aat acc cgg cgg atg gaa gaa gat 192
Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp
50 55 60

	aac	gtc	cgc	ctg	gcg	cgg	cgc	agt	agc	ggg	ggc	ggc	gcg	gtg	ttc	cac	240
	Asn	Val	Arg	Leu	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Phe	His	
	65					70					75					80	
5	gat	ctc	ggc	aat	acc	tgc	ttt	acc	ttt	atg	gct	ggc	aag	ccg	gag	tac	288
	Asp	Leu	Gly	Asn	Thr	Cys	Phe	Thr	Phe	Met	Ala	Gly	Lys	Pro	Glu	Tyr	
					85					90					95		
10	gat	aaa	act	atc	tcc	acg	tcg	att	gtg	ctc	aat	gcg	ctg	aac	gcg	ctc	336
	Asp	Lys	Thr	Ile	Ser	Thr	Ser	Ile	Val	Leu	Asn	Ala	Leu	Asn	Ala	Leu	
				100					105					110			
15	ggc	gtc	agc	gcc	gaa	gcg	tcc	gga	cgt	aac	gat	ctg	gtg	gtg	aaa	acc	384
	Gly	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Gly	Arg	Asn	Asp	Leu	Val	Val	Lys	Thr	
			115					120					125				
20	gtc	gaa	ggc	gac	cgc	aaa	gtc	tca	ggc	tcg	gcc	tat	cgc	gaa	acc	aaa	432
	Val	Glu	Gly	Asp	Arg	Lys	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	Glu	Thr	Lys	
		130					135					140					
25	gat	cgc	ggc	ttc	cac	cac	ggc	acc	ttg	cta	ctc	aat	gcc	gac	ctc	agc	480
	Asp	Arg	Gly	Phe	His	His	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Asn	Ala	Asp	Leu	Ser	
		145				150					155					160	
30	cgc	ctg	gca	aac	tat	ctc	aat	ccg	gat	aaa	aag	aaa	ctg	gcg	gcg	aaa	528
	Arg	Leu	Ala	Asn	Tyr	Leu	Asn	Pro	Asp	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Ala	Lys	
					165					170					175		
35	ggc	att	acg	tcg	gta	cgt	tcc	cgc	gtg	acc	aac	ctc	acc	gag	ctg	ttg	576
	Gly	Ile	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Arg	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	
				180					185					190			
40	ccg	ggg	atc	acc	cat	gag	cag	gtt	tgc	gag	gcc	ata	acc	gag	gcc	ttt	624
	Pro	Gly	Ile	Thr	His	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Ala	Ile	Thr	Glu	Ala	Phe	
			195					200					205				
45	ttc	gcc	cat	tat	ggc	gag	cgc	gtg	gaa	gcg	gaa	atc	atc	tcc	ccg	aac	672
	Phe	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ile	Ser	Pro	Asn	
		210					215					220					
50	aaa	acg	cca	gac	ttg	cca	aac	ttc	gcc	gaa	acc	ttt	gcc	cgc	cag	agt	720
	Lys	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Asn	Phe	Ala	Glu	Thr	Phe	Ala	Arg	Gln	Ser	
		225				230					235					240	
55	agc	tgg	gaa	tgg	aac	ttc	ggg	cag	gct	ccg	gca	ttc	tcg	cat	ctg	ctg	768
	Ser	Trp	Glu	Trp	Asn	Phe	Gly	Gln	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	His	Leu	Leu	
					245					250					255		
60	gat	gaa	cgc	ttt	acc	tgg	ggc	ggc	gtg	gaa	ctg	cat	ttc	gac	gtt	gaa	816
	Asp	Glu	Arg	Phe	Thr	Trp	Gly	Gly	Val	Glu	Leu	His	Phe	Asp	Val	Glu	
				260					265					270			
65	aaa	ggc	cat	atc	acc	cgc	gcc	cag	gtg	ttt	acc	gac	agc	ctc	aac	ccc	864
	Lys	Gly	His	Ile	Thr	Arg	Ala	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Leu	Asn	Pro	
			275					280					285				

gcg ccg ctg gaa gcc ctc gcc gga cga ctg caa ggc tgc ctg tac cgc 912
 Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg
 290 295 300

5 gca gat atg ctg caa cag gag tgc gaa gcg ctg ttg gtt gac ttc ccg 960
 Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro
 305 310 315 320

10 gaa cag gaa aaa gag cta cgg gag tta tcg gca tgg atg gcg ggg gct
 1008
 Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala
 325 330 335

15 gta agg tag
 1017
 Val Arg

20 <210> 2
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

25 <400> 2
 Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe
 1 5 10 15

30 Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln
 20 25 30

Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg
 35 40 45

35 Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp
 50 55 60

40 Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ala Val Phe His
 65 70 75 80

Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr
 85 90 95

45 Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu
 100 105 110

Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr
 115 120 125

50 Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys
 130 135 140

Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser
 145 150 155 160

Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys
165 170 175

5 Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu
180 185 190

Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe
195 200 205

10 Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn
210 215 220

Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser
225 230 235 240

15 Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu
245 250 255

20 Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu
260 265 270

Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro
275 280 285

25 Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg
290 295 300

Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro
305 310 315 320

30 Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala
325 330 335

Val Arg

35

<210> 3
<211> 30
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
45 lplA-fwd

<400> 3
cgggatccct atctgcgccct gacactcgac

30

50 <210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

55

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
lplA-rev

.5

<400> 4

cgggatcctt tatctgaacc gccatttgcg ctg

.33